

Travail du Laboratoire d'Hygiène
de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon

**Contribution à l'étude
des
rapports entre les associations
et les dissociations microbiennes**

THÈSE

PRÉSENTÉE

à la FACULTE de MÉDECINE et de PHARMACIE de LYON

et soutenue publiquement le 4 Novembre 1942

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

André AEBERHARDT

Elève de l'Ecole du Service de Santé

Diplômé d'Hygiène de l'Université de Lyon

Diplômé de Médecine et d'Hygiène Coloniales

Né le 18 Février 1916, à SAINT-IMIER (Suisse)



LYON

BOSC Frères M. & L. RIOU

IMPRIMEURS-ÉDITEURS

42, Quai Gailleton, 42

1942

**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DES RAPPORTS ENTRE LES ASSOCIATIONS
ET LES DISSOCIATIONS MICROBIENNES**

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Année Scolaire 1942-1943 — N° 4

Travail du Laboratoire d'Hygiène
de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon

**Contribution à l'étude
des
rapports entre les associations
et les dissociations microbiennes**

THÈSE

PRÉSENTÉE

à la FACULTE de MÉDECINE et de PHARMACIE de LYON

et soutenue publiquement le 4 Novembre 1942

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

André AEBERHARDT

Elève de l'Ecole du Service de Santé

Diplômé d'Hygiène de l'Université de Lyon

Diplômé de Médecine et d'Hygiène Coloniales

Né le 18 Février 1916, à SAINT-IMIER (Suisse)



LYON

BOSC Frères M. & L. RIOU

IMPRIMEURS-ÉDITEURS

42, Quai Gailleton, 42

—
1942

PERSONNEL DE LA FACULTE

Doyen honoraire	M. L. HUGOUNENQ.
Doyen	M. J. LEPINE.
Assesseur	M. A. MOREL.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. HUGOUNENQ, PIC, PAVIOT, NICOLAS, VILLARD,
NOVE-JOSSERAND, TIXIER, COLLET, GAYET, CLUZET, BERARD, COURMONT,
GUIART, PIERY, CADE, THEVENOT Léon.

PROFESSEURS

Cliniques médicales	MM. FROMENT.
Cliniques chirurgicales	SAVY.
Clinique obstétricale et Accouchements	PATEL.
Clinique ophtalmologique	SANTY.
Clinique dermatologique et syphiligraphique	RHENTER.
Clinique neurologique et psychiatrique	BONNET.
Clinique médicale infantile	FAVRE.
Clinique gynécologique	LEPINE J.
Clinique d'oto-rhino-laryngologie	MOURIQUAND.
Clinique urologique	COTTE.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	REBATTU.
Clinique et prophylaxie de la tuberculose	CIBERT.
Clinique des maladies infectieuses	TAVERNIER.
Physique biologique, Radiologie et Physiothérapie	DUFOUT.
Chimie biologique et médicale	X.
Chimie organique et Toxicologie	PONTHUS.
Matière médicale et Botanique	FLORENCE.
Parasitologie et Histoire naturelle médicale	MOREL.
Anatomie	MANCEAU.
Histologie	GARIN.
Physiologie	LATARJET.
Pathologie interne	POLICARD.
Pathologie générale et thérapeutique	HERMANN.
Anatomie pathologique	CORDIER.
Chirurgie opératoire	DECHAUME.
Médecine expérimentale et comparée et Bactériologie	MARTIN J.-F.
Médecine légale	X.
Hygiène	ARLOING (F.).
Pharmacie et Pharmacologie	MAZEL.
Hydrologie thérapeutique et Climatologie	ROCHAIX.
	LEULIER.
	GATÉ.



PROFESSEURS TITULAIRES SANS CHAIRE

Chargé d'un cours d'Embryologie	MM. NOEL.
Chargé d'un cours d'Anatomie	GABRIELLE.
Chargé d'un cours de Toxicologie	CHAMBON.

AGREGES

MM.	MM.	MM.	MM.
REVOL	CROIZAT	LEVRAT	PIFFAULT
ENSELME	DELORE	BANSILLON	FROMENT (R.)
SEDALLIAN	JOSSERAND	MALLET-GUY	MARTIN (P.-E.)
CREYSSEL	MORIN	ROMAN	MOUNIER-KUHN
DE ROUGEMONT	BERTRAND	PEYCELON	BROUSSY
P. RAVAUULT	CLAVEL	PIGEAUD	JOURDAN

EXAMINATEURS DE LA THESE

MM. ROCHAIX, *président* ; GATÉ, *assesseurs*
SÉDALLIAN et P. JOSSERAND

La Faculté de Médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.

A MA MERE ET A MON PERE

Dont la vie entière faite de travail et de sacrifices me montre le chemin à suivre. Que ce modeste travail soit pour eux l'expression de mon très grand amour filial et de ma profonde reconnaissance.

A MON FRERE

Séparé de l'amour des siens par une longue captivité, ma plus grande joie sera de le voir revenir parmi nous et de le remercier de tout ce qu'il a fait pour moi au cours de mes études.

A TOUS LES MIENS



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur ROCHAIX
Officier de la Légion d'Honneur

A NOS JUGES

Hommage respectueux.

A MES MAITRES CIVILS ET MILITAIRES

A MES CHEFS

A la Mémoire de mon Camarade de Promotion
Médecin Auxiliaire ROBERT Jean

Sa mort prématurée m'enleva mon
meilleur ami.

A TOUS MES CAMARADES DE GUERRE,
DE CAPTIVITE ET DE L'ECOLE

A TOUS MES AMIS

M. le Professeur ROCHAIX a bien voulu nous confier le sujet de cette thèse et en accepter la présidence. Au cours d'une année de recherches, ses précieux conseils nous ont permis de mener à bien notre travail, et ils nous ont rendu plus sensible le grand honneur qu'il nous a fait en nous acceptant dans son laboratoire. Nous le prions de trouver ici l'expression de notre reconnaissance.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES RAPPORTS ENTRE LES ASSOCIATIONS ET LES DISSOCIATIONS MICROBIENNES

INTRODUCTION

Après les travaux des grands cliniciens et bactériologistes du XIX^e siècle, auxquels nous devons la connaissance des principaux caractères épidémiques des maladies contagieuses, ainsi que la notion de leur périodicité, les auteurs modernes insistent beaucoup sur l'importance de la connaissance précise des variations périodiques des maladies contagieuses. A côté d'une évolution annuelle, saisonnière et d'une variation multiannuelle, des variations brusques et irrégulières modifient la courbe épidémiologique de ces maladies.

Ces modifications ont été en partie expliquées par l'influence de nombreux agents extérieurs sur les trois facteurs conditionnant une épidémie (le germe infectant, l'organisme infecté et le mode de transmission du germe), sans que l'on puisse d'une façon précise définir la part de chacun. Hornus, dans un travail publié en 1935, étudie le rôle des agents extérieurs constituant les saisons sur la périodicité des épidémies en général, et plus spécialement sur la poliomyélite. Il conclut que, si cette périodicité est sous la dépendance des variations du milieu extérieur, chacun des trois facteurs précédents est influencé : les variations de virulence de l'agent pathogène jouent un rôle dont on

ne peut actuellement préciser l'importance; le mode de transmission du germe est souvent en cause, dans le déterminisme de la périodicité saisonnière des maladies contagieuses; le terrain, par ses modifications physiologiques saisonnières ou non, intervient pour une large part.

En ce qui concerne les variations de l'agent pathogène, la notion de plénomorphisme des espèces microbiennes (soutenue dès la fin du XIX^e siècle par E. Duclaux et l'Ecole française), est actuellement admise par tous. Le pléomorphisme microbien, souvent considérable pour certaines espèces (le bacille de la peste par exemple), paraissait ne porter que sur la morphologie des microorganismes, ou tout au moins, c'était l'opinion admise. Mais en 1921, Arkwright, reprenant d'ailleurs des recherches effectuées antérieurement par Baerthlein, dégage la notion de « dissociation » microbienne. Une espèce microbienne, en effet, peut se dissocier en deux types, dont le premier caractère différentiel réside dans la forme des colonies, d'après leur aspect sur gélose : les unes sont plates, irrégulières, rugueuses — Arkwright les dénomme « Rough » ou R — les autres sont en calotte de sphère, lisses et sont appelées par ce même auteur « Smooth » ou S. Arkwright apporte la notion de la structure antigène particulière de ces formes R. Les formes différentes apparaissent sous l'influence d'une série de facteurs : nature du milieu de culture (milieux riches en peptone), vieillissement, présence dans les cultures de substances dysgénétiques (certains antiseptiques, par exemple), germes restés en contact avec des sérums spécifiques, cultures originelles provenant de produits pathologiques; parfois même, on les voit apparaître dans des cultures normalement entretenues.

Mais sous ces différences de formes, se cachent des différences profondes, soit au point de vue des carac-

tères biochimiques, soit de la virulence, soit de la valeur antigène. Ce sont habituellement les formes S qui sont virulentes, mais pas toujours.

Arkwright a d'abord décrit des types de dissociation du bacille de Shiga; puis ce phénomène a été observé pour les bacilles typhiques, paratyphiques, les *Salmonella*, le vibrion cholérique, le staphylocoque, etc...

Cette notion de dissociation a été ensuite introduite en épidémiologie par les auteurs américains, Topley en particulier, en 1924. Depuis longtemps, Netter avait soutenu à l'occasion d'épidémies de pneumococcies et de poliomyélite, que c'était le germe qui, sous des influences inconnues, acquerrait une virulence exaltée, et provoquait ainsi l'apparition des épidémies. Topley montra que les souches pathogènes et « épidémigènes » du bacille d'Aertrycke sont du type S. Dresel, Vogelsang font des remarques analogues et l'on arrive à cette conception qu'en ce qui concerne le germe, il faut que ce dernier subisse une dissociation en son type virulent, ordinairement S pour que l'épidémie apparaisse.

La question est des plus complexes puisque pour certains microbes, les souches les plus pathogènes sont du type R (Bactéridie Charbonneuse par exemple); parmi les formes S, il existe souvent de grandes différences liées à un facteur Vi, celui-ci existant parfois dans les formes R, qui seraient alors virulentes. Dans le groupe typho-paratyphique, Hornus montre qu'il existe des modes différents de dissociation : dissociation morphologique (R-S), antigène (O-H), et biologique (V-W).

Ces différentes notions ont permis à Winslow C.E.A. au Congrès microbiologique américain de 1932, de distinguer chez les microorganismes deux sortes de variations : une variation « cyclogénique » comprenant la formation des spores, les formes filtrables des

microbes, et peut-être les processus sexuels, et une variation « dissociative » consistant dans la production de deux ou de plusieurs types alternants, caractérisés par des différences nombreuses, notamment en ce qui concerne la morphologie des colonies, l'activité biochimique des germes, leur virulence. Cette notion nouvelle ne niant pas la spécificité microbienne, mais montrant que les caractères de chaque espèce microbienne sont beaucoup plus complexes que l'on pensait, et que des études plus complètes pourront peut-être permettre de résoudre certains problèmes immunologiques et épidémiologiques encore mal connus.

Mais sous quelles influences cette dissociation se produit-elle pour donner le type virulent ? Celles-ci sont encore très mal connues et parmi les nombreux travaux modernes sur les rapports entre l'épidémicité d'une affection et le type de dissociation du germe en cause, nous pouvons relever quelques-uns des facteurs pouvant intervenir. Ces travaux ont surtout porté sur les épidémies de diphtérie, dans lesquelles les trois types de dissociation du Bacille diphtérique (type G « gravis », type M « mitis » et type I « intermédiaire »), montrent des pouvoirs pathogènes différents.

Yü en 1930, étudiant 31 cas de diphtérie, ne peut isoler aucune souche rugueuse au stade aigu de la maladie, mais il isole de telles souches par ensemencement des sécrétions pharyngées de ces mêmes malades, avant leur libération. Il ne trouve aucune raison à cette variation.

Mair en 1936 à Londres, montre que 80 % des formes de diphtérie appartiennent aux type G et I; que 45 % des bacilles chez les porteurs, sains ou convalescents, sont du type M, toutes les formes non toxiques appartenant au type M. Il montre expérimentalement, *in vitro*, que les changements de types sont possibles. Il pense que, *in vivo*, ces changements de types peu-

vent dépendre des variations du terrain que constitue l'organisme du malade.

Shone, Tucker, Glass et Wright en 1939 à Liverpool, constatent l'existence de variations saisonnières ainsi qu'une certaine tendance à la localisation dans certaines régions, des différents types. Ils retrouvent également des pouvoirs pathogènes différents suivant les types : les formes graves et les toxémies étant dues aux types I et G, les cas de complications laryngées ayant conduit à des trachéotomies étant dues aux types M.

Comme Robinson et Marschall l'avaient noté à Manchester en 1935, Shone et ses collaborateurs montrent qu'au cours de l'été 1937, les types M remplacèrent les types I.

Max Gundel signale que quand une épidémie se prolonge, il apparaît d'autres types.

Hilgers et Thoenes constatent un plus grand nombre de morts chez les diphtériques à type M, mais notent une fréquence anormalement élevée des changements de types après examens successifs, ainsi que beaucoup d'infections mixtes.

Citons encore les résultats de J. W. MacLeod, Hester E. de C. Woodcock en 1939, car ils apportent une notion nouvelle : au cours d'une épidémie à Leeds, dans une école, ces auteurs signalent trois cas de diphtérie à type G; puis 8 semaines après le retour des enfants à l'école, une nouvelle épidémie mais à type I apparaît, donnant 6 morts sur 13. L'anatomie pathologique a montré que, dans la plupart des cas graves, on avait une association entre Bacille diphtérique et « *Hémophilus influenzae* », ayant provoqué des lésions pulmonaires constantes à type broncho-hémorragique.

Ces différents auteurs, ainsi que Pesch, Hettche (1935), Preuner (1936), admettent que le passage d'un

type à l'autre est possible sous des influences diverses (prolongation d'une épidémie, saisons, associations avec « *Hémophilus influenzae* »). D'autres auteurs comme Anderson (1931), Robinson (1934), Murray (1935), Clauberg (1936) contestent la possibilité de ces variations de types.

En ce qui concerne le Staphylocoque, MM. Rochaix et Rivollier ont obtenu en 1935-1939 une dissociation en deux types A et B. Les souches A, dorées, les plus virulentes, ont montré une variation correspondant à un mélange des deux types, survenant trois ans de suite de l'automne au printemps. Dans l'organisme humain, cette dissociation se produit spontanément avec passage d'un type à l'autre ; elle est, sans doute, fonction des conditions physico-chimiques régissant la nature du terrain sur lequel évolue le Staphylocoque.

Jausion a montré que les conditions de terrain provoquaient l'apparition de l'un ou de l'autre type dans les staphylococcies cutanées ; les conditions hormonales de la puberté et la séborrhée qu'elle engendre exaltent le Staphylocoque blanc, qui produit la pustule acnéïque sur un terrain où vient d'être défait le Bacille de Koch. Le développement du Staphylocoque doré paraît influencé par l'état hépatique et par le métabolisme des glucides, mais il n'est pas influencé par les fluctuations séborrhéïques. Il déterminerait surtout la folliculite, les furoncles, les anthrax, les loupes suppurées.

Nous nous sommes proposé d'étudier l'un des facteurs possibles de la dissociation en type virulent : l'association microbienne. On sait combien les associations microbiennes sont graves ; il nous suffit de rappeler la nécessité de la présence de microbes tels que le Bacille Prodigiosus ou le Protéus Vulgaris pour

l'éclosion du tétanos, et la gravité des strepto-diphthéries.

On peut se demander si la présence d'un microbe satellite, même non pathogène, n'intervient pas dans le phénomène de la dissociation d'un bacille pathogène pour faire apparaître son type virulent. Ce qui expliquerait l'aggravation de la maladie, l'apparition de cette dernière et sa diffusion sous forme épidémique, et peut-être aussi les variations brusques et irrégulières constatées dans les courbes épidémiologiques des maladies contagieuses.

Nos recherches ont porté sur l'association Bacille Pyocyanique - Bactéridie Charbonneuse, et ceci pour différentes raisons ; tout d'abord, le B. Pyocyanique exerce sur la B. Charbonneuse une action antibiotique et antagoniste (en utilisant ici la terminologie de MM. PAPACOSTAS et GATÉ), qui a été étudiée par de nombreux auteurs. Les différences très nettes de pigmentation, de forme des colonies, de colorabilité des germes, permettent une détermination précise et rapide des deux microbes. D'autre part, toute étude sur la dissociation microbienne, comme l'ont montré Chodat en 1926 et Marchal en 1932, doit être effectuée sur des souches ayant pour origine une plastide microbienne unique. La B. Charbonneuse, par sa taille, son immobilité, est d'un isolement plus commode ; nous donnerons au cours de l'exposé de nos recherches personnelles les raisons du choix de la méthode que nous avons utilisée.

Nous avons donc étudié l'action du B. Pyocyanique ainsi que l'action du filtrat de culture en bouillon de ce même bacille, sur la B. Charbonneuse. Ces recherches se sont révélées très longues du fait de la difficulté à obtenir des souches à origine monomicrobienne. Elles nous ont conduit à une dissociation que nous avons étudiée au point de vue des caractères

morphologiques et biochimiques uniquement, car la nécessité de soutenir notre thèse plus rapidement que nous ne le pensions, et la difficulté actuelle de nous procurer en nombre suffisant les animaux d'expériences dont nous aurions eu besoin, ne nous ont pas permis de compléter cette étude par celle des modifications possibles de la virulence et du pouvoir antigène. Nos résultats restent donc incomplets et une étude ultérieure reste nécessaire, et elle permettra peut-être de généraliser à de nombreux microbes cette notion de dissociation microbienne provoquée par une association de deux germes.

PREMIERE PARTIE

CHAPITRE PREMIER

ASSOCIATION PYOCYANIQUE-CHARBON

Après les premières observations de Pasteur en 1863 sur les associations microbiennes, cette question fut l'objet de très nombreuses études jusqu'en 1900. Après une éclipse de longue durée, le problème des microbes de sortie et la découverte du bactériophage de d'Hérelle donnèrent lieu à de nouvelles recherches. Et, en 1926, MM. Papacostas et Gaté publièrent un important travail, synthèse des connaissances acquises à cette date sur cette question, ainsi que leurs travaux personnels. Quelques publications plus récentes sont venues ajouter quelques notions nouvelles au cours de ces dernières années.

Nous allons rappeler brièvement les connaissances que nous possédons au sujet de l'association Bacille Pyocyanique et Bactéridie Charbonneuse, qui a servi de base à nos recherches.

Nous employerons la terminologie préconisée par MM. Papacostas et Gaté et c'est ainsi que nous définirons :

1° « Stimulation », le résultat de l'action favorisante observée dans l'association de deux microbes *in vitro*.

2° « Antibiose », le résultat de l'association *in vitro* de deux microbes, quand nous observons une action empêchante de l'un des deux germes.

3° « Synergie », l'action favorisante observée *in vivo*.

4° « Antagonisme », l'action empêchante observée *in vivo*.

Il est bien évident que ces actions peuvent être soit unilatérales, soit réciproques, suivant que l'action observée s'exerce sur un seul ou sur les deux microbes en présence.

En 1877, Pasteur, de même qu'il fut le premier à signaler le problème des associations microbiennes, constate le rôle empêchant de certaines associations microbiennes sur le développement de la Bactéridie Charbonneuse. Tomkins en 1887, ensemençant en milieu solide du pus bleu d'une plaie charbonneuse, obtient des cultures mixtes de B. Charbonneuse et de B. Pyocyanique, ces derniers en plus grand nombre. En repiquant, Tomkins a constaté que le nombre des B. Charbonneuses diminuait au deuxième repiquage pour disparaître au troisième. Bouchard en 1889 étudie l'association précédente *in vivo*, (et met en évidence la propriété antagoniste du B. Pyocyanique pour la B. Charbonneuse.

Charrin et Guignard, en 1889, à la suite des expériences de Bouchard, étudient cette association *in vitro* et démontrent la propriété antibiotique de ce même microbe vis-à-vis de la B. Charbonneuse.

Voyons quels ont été les résultats obtenus, d'une part au sujet de l'antibiose, et, d'autre part, au sujet de l'antagonisme entre ces deux microbes.

I. — Antibiose pyocyanique-charbon

Charrin et Guignard (1889) montrent qu'au contact du B. Pyocyanique ou des produits de sécrétion

de ce bacille, la B. Charbonneuse s'altère rapidement et sa virulence diminue rapidement. Ces auteurs concluent que le B. Pyocyanique sécrète des substances nuisibles pour la B. Charbonneuse, et l'atténue ainsi par épuisement du milieu (l'adjonction de bouillon neuf au milieu rendant à la B. Charbonneuse un certain degré de vitalité).

Pane en 1910 montre qu'en moins de un mois à 15°, et en quelques jours à 35°, la B. Charbonneuse disparaît dans les cultures de B. Pyocyanique.

Fortineau, en 1910, fait d'importantes recherches sur cette association et montre que, *in vitro*, la B. Charbonneuse cultive mal, ne sporule pas et disparaît au bout de deux mois.

Plus récemment, Urbain et Mlle T. Kowarski en 1934, reprennent l'étude de l'association de divers germes avec la B. Charbonneuse. Ces auteurs montrent successivement, au sujet du B. Pyocyanique que :

a) En ensemençant une goutte de culture de B. Charbonneuse dans un tube de bouillon contenant une culture de 24 h. de B. Pyocyanique, mise à l'étuve à 37° (par examen chaque jour sur frottis et par ensemencement sur gélose inclinée), la B. Charbonneuse ne pousse pas ou pousse très mal. Au bout de deux jours, il n'y a plus de B. Charbonneuse.

b) En ajoutant à des cultures en bouillon de 24 h. de charbon, une goutte de culture en bouillon de B. Pyocyanique, avec les mêmes conditions d'examen que précédemment, le B. Pyocyanique arrête la culture de B. Charbonneuse après 36 h. ou 48 h. de contact.

c) En ensemençant simultanément dans des tubes de bouillon Martin une goutte de culture de B. Charbonneuse et une goutte de culture de B. Pyocyanique,

ce dernier empêche le développement de la B. Charbonneuse.

Ces auteurs concluent que le B. Pyocyannique présente vis-à-vis de la B. Charbonneuse une antibiose très marquée, rendant impossible le développement de la B. Charbonneuse.

II. — Antagonisme pyocyannique-charbon

Les études au sujet de l'antagonisme ont été plus nombreuses et conduisent à des résultats analogues.

Bouchard en 1889, inocule des B. Charbonneuses au lapin et au cobaye, et injecte autour du point d'inoculation des doses variables de B. Pyocyannique. Au cours de 26 expériences, 12 fois il observe la survie de l'animal inoculé et sa guérison, et 7 fois la mort de l'animal sans trace de charbon. Les témoins sont tous morts de charbon.

Freudenreich, en 1889, fait une série d'expériences sur des lapins et des cobayes présentant déjà l'infection charbonneuse, aux stades différents de son évolution. Il inocule à ces animaux des cultures pures et des cultures stérilisées de B. Pyocyannique ; il conclut que le B. Pyocyannique provoque un ralentissement de l'infection charbonneuse.

Charrin et Guignard, en 1889, étudient sur des cobayes l'action de cultures mélangées de B. Charbonneuse et de B. Pyocyannique ; la virulence des premières diminue considérablement, au bout d'un certain temps, et bien que les animaux succombent, la mort est nettement retardée par rapport aux témoins.

Woodhead et Wood, en 1889, étudient l'action des cultures stérilisées de B. Pyocyannique sur l'évolution du Charbon expérimental, par injection sous-cutané.

née chez des animaux infectés préalablement par le Charbon, de cultures stérilisées de pus bleu, ils arrivent à arrêter le développement fatal du Charbon et obtiennent la guérison d'un certain nombre d'animaux.

Bouchard, en 1890, reproduisant les expériences précédentes obtient des résultats différents : sans nier une certaine influence des cultures stérilisées du B. Pyocyanique sur l'évolution du Charbon, il n'a jamais vu les animaux guérir d'une façon définitive.

Blagovestschensky, en 1890, constate, comme Bouchard, que les cultures vivantes de B. Pyocyanique ont, vis-à-vis du charbon, une action plus marquée que les cultures stérilisées. Par inoculation simultanée dans la chambre antérieure de l'œil de B. Pyocyanique et de B. Charbonneuse, le premier s'oppose dans la grande majorité des cas au développement *in situ* des B. Charbonneuses, sans toutefois rendre les animaux à quelques exceptions près, réfractaires à une injection charbonneuse faite par une autre voie. La B. Charbonneuse disparaît de l'œil au bout de 115 h. au maximum. Les B. Pyocyaniques inoculés à une certaine distance des B. Charbonneuses exercent une action beaucoup moins intense.

Charrin et J. Courmont, en 1893, démontrent que le sérum des lapins inoculés avec le B. Pyocyanique contient des substances qui atténuent, dans une mesure variable, mais jamais très grande, la B. Charbonneuse.

Palleroni, en 1894, conclut de ses recherches sur le Charbon expérimental, que le B. Pyocyanique a, *in vivo*, une action empêchante sur la B. Charbonneuse.

Delarbre, en 1906, montre que les cultures mixtes de B. Pyocyanique et de B. Charbonneuse sont très peu virulentes. Les lapins vaccinés contre le B. Pyo-

cyanique sont réfractaires au Charbon. Inoculés 7 et même 24 heures après la B. Charbonneuse, la toxine pyocyanique serait curative du Charbon, chez le lapin et chez le cobaye. Cette toxine étant très peu nocive, l'auteur pense que l'on pourrait peut-être l'essayer en cas de Charbon chez l'animal.

D'Agata (1909) veut se rendre compte si l'inoculation d'un mélange de B. Pyocyanique et de B. Charbonneuse qui empêche l'infection du lapin, peut également préserver les ovidés contre le Charbon. Il emploie dans ce but la méthode de Pané : du bouillon dans lequel a cultivé pendant 4 jours du B. Pyocyanique est stérilisé à 55° pendant une heure, réparti dans des tubes à la dose de 1 cc. et additionné d'une quantité égale de bouillon dans lequel a cultivé une B. Charbonneuse très virulente pendant 24 à 36 heures. Le contact est maintenu de 10 à 20 jours. Un contact de 10 jours permet d'obtenir un vaccin ne tuant plus le lapin, mais tuant encore le mouton ; un contact de 18 à 20 jours suffit à rendre le mélange inoffensif pour les ovidés, et à lui donner les qualités d'un vaccin. Mais ici, remarquons que la toxine pyocyanique pendant son contact *in vitro* durant plusieurs jours a déjà agi sur la B. Charbonneuse par ses propriétés antibiotiques.

Fortineau en 1910 fit de nombreuses expériences et des essais thérapeutiques importants ; 15 cobayes sont inoculés avec 1/2 cc. de culture mixte, vieilles de deux jours à trois mois ; 5 résistent, les autres meurent d'infection à B. Pyocyanique mais pas de Charbon. Les cobayes qui ont résisté ne sont pas vaccinés (résultats identiques à ceux de d'Agata). Une culture de B. Charbonneuse dans la toxine pyocyanique âgée de 48 heures a tué 5 cobayes sur 6 ; deux animaux seulement présentaient des B. Charbonneuses à l'autopsie.

La toxine pyocyanique injectée préventivement ne protège pas le cobaye contre l'inoculation du Charbon : un lapin toutefois a résisté. Les cobayes vaccinés contre le B. Pyocyanique restent sensibles au Charbon, mais deux lapins sur quatre résistent. Cobayes et lapins infectés de Charbon et traités par la toxine pyocyanique ne succombent presque jamais. Il en est de même quand la toxine est injectée en un autre point que celui où a été inoculé le Charbon. Dans un mémoire présenté à l'Académie des Sciences, en 1910, Fortineau donne les résultats obtenus en traitant par la pyocyanase des moutons charbonneux et un cas de pustule maligne : les moutons traités au nombre de 4 ont tous résisté ; les résultats ont été assez favorables dans le cas de la pustule maligne.

Vignaud, en 1912, traite trois cas de Charbon humain par la pyocyanase. Dans les deux premiers cas (pustule de la nuque et de la face), une seule injection de 20 cc. a suffi pour faire disparaître tous les phénomènes inquiétants. Le troisième cas fut suivi de guérison lente : pustule grave avec œdème de la glotte et dysphagie intense.

Isabolensky, en 1913, montre que la pyocyanase injectée à des souris en même temps qu'une dose mortelle de B. Charbonneuse (à la dose de 0,5 cc.) ne prévient pas l'issue fatale, mais retarde la mort des animaux.

Silberschmidt et Schoch, en 1920, constataient que le B. Pyocyanique exerce une action antibiotique et antagoniste sur la B. Charbonneuse par l'action dissolvante de la pyocyanase. Ces propriétés sont surtout nettes quand les deux microbes sont injectés simultanément au même point. Elles ne se manifestent pas toujours quand la deuxième culture est inoculée à une certaine distance. Quand les deux cultures sont inoculées à 8 heures d'intervalle, on ne constate

pas d'antagonisme : les animaux meurent de Charbon.

Locein et Fortineau en 1914 rapportent les résultats obtenus dans 50 cas de Charbon humain traités par les injections de pyocyanéine (cultures de B. Pyocyanique sur milieu minéral stérilisées à 70° pendant une heure) : 5 malades seulement succombèrent. Ces cas malheureux survinrent chez des sujets gravement atteints au moment où fut instauré le traitement (une seule injection de 10 cc. de pyocyanéine sous-cutanée).

A. Urbain, en 1931, indique une nouvelle technique de préparation de vaccin anticharbonneux en utilisant l'antagonisme pyocyanique-charbon. Des cultures de B. Pyocyanique sur milieu minéral de Favreul et Fortineau après trois semaines, sont tuées à 70 degrés pendant une heure au bain-marie. Ces cultures, injectées seules, à haute dose (200 cc.) sous-cutanées à un cheval déjà immunisé contre le Charbon restent sans effet sur celui-ci (petit œdème au point d'inoculation). Mais avec un mélange de B. Charbonneuse et de cultures de B. Pyocyanique (150 cc. de culture de Pyocyanique et 0,01 cgr. de culture sur gélose de B. Charbonneuse virulente), injecté sous-cutané, on obtient chez le cheval une réaction locale au point d'inoculation (œdème dur, chaud, douloureux, et persistant trois à quatre jours) avec réaction générale (température à 39°, 40°5, tremblements musculaires, perte d'appétit). Ces injections renouvelées tous les quinze jours avec des doses croissantes de B. Charbonneuse, donnent chaque fois les mêmes réactions. Au bout de quatre injections, le cheval est susceptible de recevoir 5 à 6 cgr. de culture sur gélose de B. Charbonneuse. Le sérum de ce cheval ainsi immunisé, provenant d'une saignée faite 12 jours après la dernière injection, est ordinairement très actif pour le cobaye,

mais toutes les saignées ne fournissent pas un sérum de valeur égale. Ce sérum est très riche en anticorps.

Nous voyons par toutes ces recherches que l'étude de cet antagonisme a été très poussée, et que des résultats intéressants au point de vue thérapeutique en ont découlé.

Quant au mécanisme de ces phénomènes d'antibiose et d'antagonisme, et malgré trente ans de recherches, celui-ci reste complètement inconnu. Il est certain que le B. Pyocyanique fait disparaître du milieu une substance utile au développement de la B. Charbonneuse (expérience de Charrin et Guignard); mais il est aussi certain que la toxine secrétée par le B. Pyocyanique joue un rôle très important. Cette toxine, appelée Pyocyanase par Emmerich et Lœw, Pyocyanéine par Fortineau, a été étudiée par plusieurs auteurs.

Emmerich et Lœw (1889) montrent que l'action antibiotique du B. Pyocyanique est due aux propriétés bactériolytiques de la pyocyanase, obtenue par filtration de vieilles cultures en bouillon, puis évaporation au 1/10, précipitation par l'alcool; le précipité dissous dans l'eau, possède des propriétés bactériolytiques sur différents microbes, et notamment sur la B. Charbonneuse. Ces auteurs considèrent la toxine pyocyanique comme un ferment tryptique.

Raubitschek et Russ (1908) montrent que sa solubilité dans l'alcool, le benzol, l'éther, l'acétone, le chloroforme, sa résistance à l'ébullition, l'éloignent des ferments. Chatton, en 1927, montre que la toxine est composée d'une cytolysine, thermostable et ne passant pas à travers les filtres de Chamberland et d'une protéolysine, détruite à 100° et passant à travers les bougies L.I. L'action cytolytique est provoquée par le jeu de la tension superficielle de l'extrait pyocyanique, plus faible que celle de l'eau. Ces au-

teurs pensent que cet extrait est un lipoïde glucosidique ou un glucoside véhiculé par un lipoïde.

Birch, Hirschfeld, en 1934, montrent que l'effet bactéricide des solutions de pyocyanase repose sur leur teneur en acides gras, à grosses molécules qui se trouvent pour la plus grande partie sous forme de sels solubles, et pour une plus faible partie sous forme d'acides libres ; et l'action hémolytique étant de même liée à la présence d'acides gras.

De toutes ces recherches, dans lesquelles nous notons cependant quelques divergences, ressort l'extrême puissance de l'action antibiotique et antagoniste du B. Pyocyanique vis-à-vis de la B. Charbonneuse. Le fait de la diminution de la virulence, et aussi celui de la possibilité de la création d'une immunité transmissible passivement, ont permis des espoirs thérapeutiques qui se sont révélés utilisables pratiquement.

Dans nos expériences personnelles, nous avons voulu nous rendre compte si, dans une telle association microbienne, il n'était pas possible de provoquer ou de mettre en évidence une dissociation ; celle-ci étant, en général accompagnée d'une variation dans la virulence ; la présence d'un pouvoir bactériolytique et protéolytique de la pyocyanase n'est pas suffisante pour expliquer la formation des anticorps.

D'autre part, nos expériences nous ont montré que, dans ce cas particulier, l'association microbienne étudiée provoquait une dissociation chez l'un des deux microbes en présence ; nous retrouvons ici les résultats obtenus par Viridis au sujet de l'association Charbon - B. Coli ; d'autres recherches dans ce sens permettront peut-être de généraliser à toutes les associations microbiennes ce processus de dissociation ; ce processus pouvant être un des mécanismes des variations observées cliniquement dans la virulence microbienne et dans les courbes épidémiologiques des épidémies.

CHAPITRE II

DISSOCIATION DE LA BACTERIDIE CHARBONNEUSE

Arkwright, étudiant les variations dans le groupe typho-coli-dysentérique, distingue le premier, les colonies obtenues en deux types et appelle S (smooth) les colonies normales et R (rough) les colonies modifiées, en se basant sur leur aspect morphologique et emploie le terme de dissociation pour désigner ces modifications ; les colonies S étant rondes, brillantes, transparentes, à surface lisse, et les colonies R présentant des bords irréguliers, opaques, à surface rude. Il est utile de noter dès maintenant que, pour certains groupes de microbes (Typhique, Coli, Vibrien Cholérique, Dysentériques), les colonies normales sont d'aspect S, tandis que, pour d'autres microbes (Subtilis), et pour la Bactéridie Charbonneuse, les colonies normales présentent le type R.

Avant que Nungester, en 1929, réunisse en types bien définis les différents aspects morphologiques présentés par la B. Charbonneuse, et qu'il en signale les modifications biochimiques et biologiques qui accompagnent les modifications morphologiques, de nombreux auteurs, soit par l'étude de souches isolées d'animaux et cultivées sur des milieux ordinaires, soit par l'étude de souches soumises à des conditions de culture modifiées, avaient obtenu des bacilles qui s'éloignaient du type normal par l'aspect des colonies

ou par celui des bacilles les composant, avec parfois des variations de virulence assez importantes.

Roux et Chamberland, en 1883, par addition au milieu d'acide phénique ou de bichromate de potasse, Behring en 1889 par addition d'acide rosolique, obtiennent des races asporogènes. Roux, en 1890, montre que le contact avec l'antiseptique doit être assez prolongé. Phisalix, en 1893, par la méthode de Pasteur, soumet des souches à une température de 42° pendant 25 passages; dès le huitième passage, il note une diminution de la virulence et la perte de la faculté de donner des spores, propriété qui réapparaît par ensemencement sur bouillon et culture à 30°; mais à partir du quatorzième passage, la disparition des spores est définitive. Zwickh en 1880 et 1890, isole à partir des organes d'un rat inoculé avec une culture virulente de B. Charbonneuse, des bacilles donnant des colonies à bords réguliers et à virulence atténuée. Phisalix (1900), par inoculation intra-péritonéale à des chiens, de ganglions d'un chien infecté par le Charbon et mort en huit jours, isole des éléments cocciformes, asporogènes, avirulents, qu'il nomme « *bacillus anthracis brevigemmans* ». Bongert (1903), à partir d'animaux morts de Charbon, isole des colonies différentes de la normale, et qui peuvent être comparées à celles du type S actuel.

Zironi (1919), de l'œdème sous-cutané d'un rat blanc mort de Charbon expérimental, isole de nombreux bacilles cocciformes, groupés deux à deux, dépourvus de spores et de capsules, et Gram négatif. Les éléments, par passage à travers les animaux, se montrent avirulents pour les cobayes et pour les lapins. Les bacilles furent dénommés par Zironi « *Bacillus anthracis colisimile* ».

Wagner (1920), d'un cas de Charbon humain, isole deux types de colonies qu'il appelle A et B. Les colo-

nies A sont semblables au type R actuel, mais manquent de virulence. Georghiu (1934), ayant isolé à partir d'un cheval mort de Charbon, un bacille de forme classique, effectue des passages sur lapins et observe qu'après les premiers passages il obtient une maladie classique, tandis qu'ensuite, il observe uniquement une réaction locale qui disparaît au bout de 4 à 6 jours. Bail et Flaumenhaft (1914-1917), isolent des colonies dénommées α et β , de cultures de B. Charbonneuse à 42° C., semblables aux types actuels S et R. Henri en 1914, par exposition à la lumière solaire, obtient des éléments bacillaires cocciformes, réunis deux à deux, Gram positif, et des formes filamenteuses, Gram négatif. Bordet et Renaux, en 1930, par culture sur gélose additionnée de chlorure de calcium, après de nombreux passages, obtiennent un type A filamenteux et sporogène, et un type B à bacilles courts, isolés et sporogènes. Le type B est très virulent pour le cobaye, A est avirulent.

Gorrieri, en 1932, par la même méthode, supprime la propriété sporogène et le pouvoir pathogène des B. Charbonneuses, en observant en même temps des modifications macroscopiques et microscopiques des colonies (surface jaune mate, disposition des chaînes variables).

Mais toutes ces modifications de la B. Charbonneuse par changement du milieu, doivent être considérées pour la plupart comme des variations ne rentrant pas dans le cadre de la dissociation microbienne, toutes ces variations étant relatives à des caractères particuliers. Cependant, certains travaux précités peuvent rappeler par les résultats obtenus les types de dissociation de la B. Charbonneuse, que de nombreux auteurs après Nungester ont précisés. Toutefois, notons ici encore, que de nombreuses divergences existent

dans les résultats publiés, et les conditions d'étude de la dissociation microbienne doivent être précisées.

Notons, avant d'étudier les types connus actuellement, après les travaux de Chodat (1926) et de Marchal (1932), qu'il est absolument nécessaire de prendre comme souches d'expérience, des souches ayant pour origine un seul élément microbien, afin d'éliminer les variations possibles dues à l'hétérogénéité de types d'une culture. Mais cette condition n'a pas été considérée comme indispensable par la plupart des auteurs. D'autre part, Marchal montre qu'il est nécessaire dans l'isolement de cette plastide microbienne unique, de se mettre à l'abri des contaminations atmosphériques. Nous verrons dans un chapitre suivant, les méthodes utilisées pour éviter au maximum ces contaminations. Nous verrons, après les travaux de Schaefer, et cela plus spécialement en ce qui concerne la *B. Charbonneuse*, que les types de dissociation obtenus présentent des aspects morphologiques différents suivant le milieu utilisé pour les mettre en évidence ; ceci permet d'expliquer certaines divergences dans la dénomination d'un type.

L'étude de la dissociation de la *B. Charbonneuse*, au sens d'Arkwright, c'est-à-dire comportant à la fois des différences morphologiques, biochimiques et biologiques, ayant donné lieu à de très nombreux travaux au cours de ces dix dernières années, depuis les travaux de Nungester, nous allons passer en revue les résultats obtenus par les différents auteurs.

Nungester, en 1929, étudie une souche de *B. Charbonneuse* conservée au laboratoire depuis longtemps. Il la cultive dans des conditions très variées (variation du pH, addition de glucose, de phénol, de sérums normaux de lapin, de cobaye, de souris, culture en bouillon non salé ou non peptoné); il décrit six types de colonies qu'il appelle R, RS, S, Rm, Sm, P.

Type R. — Colonies normales, rugueuses, sèches, à bords déchiquetés avec « tête de Méduse » très marquée, composées d'éléments encapsulés, sporogènes, disposés en filaments, possédant les propriétés biochimiques et biologiques classiques de la B. Charbonneuse ; ces bacilles sont virulents pour le cobaye, le tuant avant 48 heures.

Type S. — Colonies modifiées : lisses, humides, transparentes, à bords réguliers, sans « tête de Méduse », à éléments isolés ou réunis en chaîne de peu de bacilles, sporogènes, Gram positif dans 95 % des cas. Ces colonies facilement émulsionnables, présentent dans la région supérieure du liquide un anneau qui se dépose rapidement au fond sous forme de granules. Ces colonies ont tendance à donner des colonies intermédiaires RS. Ce type est virulent, mais il perd sa virulence par vieillissement.

Type RS. — Ce type présente des caractères des deux précédents, avec « tête de Méduse » peu marquée, virulence conservée.

Type Rm (Mucoïde), voisin du type R. — La virulence est conservée pour le cobaye qui succombe avec un certain retard (100 heures).

Type Sm (Mucoïde), voisin du type S. — Ce type est moins virulent pour le cobaye.

Type P. — Colonies petites, transparentes, certaines ayant des caractères R (Rp) ou S (Sp). Colonies de virulence variable, peu visibles à l'œil nu.

L'emploi des milieux modifiés précédents a permis à cet auteur d'observer le passage d'un type en un autre.

Mazzetti, en 1932, étudiant une culture vieille de un mois d'une souche de B. Charbonneuse asporogène, observe la dissociation en types RS et S, et il

obtient aussi une dissociation à partir d'une souche normale par repiquage tous les deux jours en bouillon ; après 47 repiquages, il observe des colonies R et S, mais sans modification de la virulence.

G. Sanarelli et A. Alessandrini, en 1933, abandonnent des cultures de B. Charbonneuse dans des sacs de collodion dans la cavité péritonéale du lapin ; ils constatent par des examens successifs, que la virulence des bacilles s'atténue progressivement. L'étude des variations morphologiques et biologiques de ces bacilles atténués a été faite par N. Favia qui a obtenu de toutes ces souches, atténuées ou non, les trois types de colonies correspondant aux types d'Arkwright. Les colonies S présentaient les caractères suivants : colonies lisses, compactes, arrondies, donnant en bouillon un trouble uniforme sans pellicule, ne donnant pas de prolongements latéraux le long du trajet d'inoculation en gélatine, liquéfiant fortement la gélatine. Au point de vue de la virulence, ce type S tue la souris et le cobaye, mais pas le lapin. Pour cet auteur, les colonies S représentent un état de moindre résistance et de souffrance de la B. Charbonneuse ; ces colonies S se trouvent uniquement dans les souches laissées de 34 à 83 jours dans la cavité péritonéale du lapin, tandis que les souches ayant séjourné 133 jours dans ce milieu ne contiennent que des formes R. Ces colonies R perdent d'ailleurs une partie de leur virulence sans changer de type. Notons que Favia utilise comme milieu de différenciation la gélose. Dans les vaccins anticharbonneux de l'Institut Pasteur, Favia trouve dans le premier vaccin presque uniquement des colonies R, tandis que dans le deuxième vaccin, il observe les trois types de dissociation.

Cormio, en 1933, emploie des cultures en bouillon maintenues à 42° C., pendant 40 jours. Il obtient une

dissociation avec apparition de propriétés vaccinales pour le lapin, mais pas pour le cobaye.

Vanni, en 1934, étudie les variations de la B. Charbonneuse en la cultivant en association avec le Bacille de Koch, en bouillon glycérimé à 2% et à pH 7,14, à la température de 37°. Le développement de la B. Charbonneuse fut régulier, mais après des passages périodiques sur gélose, après 40 jours d'étuve, l'auteur obtient des colonies RS et au 60^e jour il obtient des colonies S. La virulence n'est pas modifiée, mais on note un retard dans la mort des animaux. Nous ne pouvons pas, dans cette expérience, retenir le rôle de l'association avec le bacille de Koch, car les conditions de culture en bouillon glycérimé peuvent expliquer à elles seules les modifications obtenues. Schaefer en 1936, étudiant la morphologie de la B. Charbonneuse, constate que les colonies lisses sont constituées par des germes encapsulés, ceux des colonies R n'ayant pas de capsules. Mais cette encapsulation dépend des conditions de culture : pour les souches virulentes, elle est complète sur les milieux à base de sérum et incomplète ou absente sur les milieux ordinaires. Cet auteur note aussi que les colonies virulentes sont R sur gélose ordinaire et S sur sérum coagulé. Les souches atténuées, au contraire, s'encapsulent et apparaissent sur tous les milieux, lisses. Nous notons ici une contradiction avec les résultats de Favia qui trouve une souche avirulente de type R sur gélose. Schaefer étudie ensuite les souches virulentes ou atténuées de la B. Charbonneuse qui se présentent sous forme de colonies lisses, transparentes, muqueuses et émulsionnables sur sérum coagulé. Ces souches peuvent se dissocier *in vitro* et *in vivo*, en variantes à colonies rugueuses et opaques. Max Sterne, en 1937, étudiant les effets de l'acide carbonique sur la formation des capsules et des spores de la B. Charbonneuse, en uti-

lisant comme milieu la gélose, note qu'une pression assez élevée de CO₂ stimule la formation des capsules des souches virulentes R. Mais à côté de ces souches virulentes R, cet auteur obtient à partir de colonies mucoides S des variantes R moins virulentes que les S, dont elles dérivent. Cette perte de la virulence et du caractère S ayant été de pair avec la perte de l'aptitude à produire des capsules *in vitro* et *in vivo*, les colonies R n'ayant pas de capsules.

Mais les études les plus récentes ont été effectuées dans le service de M. A. Boquet à l'Institut Pasteur, par Yoshio Takahashi en 1939. Après avoir montré la nécessité d'opérer sur des souches à point de départ monomicrobien, Takahashi isole les trois souches qu'il étudie par la méthode de Nakamura. Il provoque la dissociation, d'une part en laissant vieillir pendant plus d'un mois à la température du laboratoire ou à l'étuve les cultures sur gélose ou en bouillon ordinaire transplantées directement à partir des colonies unicellulaires; d'autre part, *in vivo*, par inoculation sous-cutanée ou intra-veineuse au cobaye et à la souris, de cultures unicellulaires en bouillon à 37° âgées de 20 à 24 heures.

La différenciation des colonies est obtenue par culture sur sérum de cheval coagulé à 75° en position inclinée pendant une heure. Par ensemencement direct sur ce milieu des vieilles cultures, de sang du cœur ou de liquide d'œdème, cet auteur obtient deux sortes de colonies :

1° *Colonies S* : lisses, rondes ou ovales, bombées, luisantes, à bords réguliers.

2° *Colonies R* : rugueuses, mates, sèches, plates, à bords irréguliers; ondulées en surface, plus petites que les colonies S.

Au microscope, les colonies présentent des bacilles

en chaîne, entourés de substance capsulaire, colorable en rose par le bleu de méthylène de Löffler, les colonies R ne montrent pas d'éléments encapsulés ou très peu. Les colonies obtenues, sur gélose, ne montrent aucune différence et prennent toutes deux l'aspect de colonies en tête de Méduse, givrées, rugueuses. Toutes les colonies, isolées à l'état pur par repiquage sur sérum coagulé, ont conservé par la suite les mêmes caractères.

L'auteur pense que c'est l'élément microbien lui-même qui subit des modifications temporaires ou permanentes. La dissociation étant un phénomène de dégradation qui se traduit par la perte de la propriété capsulogène et de la virulence. Il survient graduellement ou brusquement selon les conditions de la végétation. En effet, le retour des formes R à S s'effectuant entre certaines limites par passage sur l'animal; celles-ci dépassées, la variante R ne ferait plus retour à S.

Nous voyons que, pour Takahashi, la forme normale de la B. Charbonneuse se présente sous le type S sur sérum coagulé.

L'auteur note que la plupart des formes R sont plus ou moins capsulogènes chez l'animal bien qu'elles soient acapsulogènes sur sérum coagulé, et sans retour à S. Tant qu'elles sont avec capsules, les formes sont plus ou moins virulentes. L'auteur a obtenu une seule forme sans capsule *in vitro* et *in vivo*, n'étant plus virulente mais étant œdémateuse.

De toutes ces études sur la dissociation de la Bactéridie Charbonneuse, il est difficile de dresser un schéma précis des types obtenus par les différents auteurs. Les six types décrits par Nungester n'ont pas tous été retrouvé par les autres auteurs, aussi peut-on considérer tous ces types comme comprenant à la fois des types définis et des types intermédiaires.

Les autres auteurs cités ne considèrent que trois

types de dissociation se rapprochant ainsi des conclusions d'Arkwright. Et parmi ces trois types, un est intermédiaire, susceptible de donner par ensemencement, les deux autres types extrêmes; mais dans certaines conditions, il est possible d'obtenir ce type à l'état pur et stable. Le passage d'un type en l'autre étant possible également dans certaines conditions. Les différences notées au cours de cet exposé proviennent en grande partie des milieux variables au moyen desquels les auteurs mettent la dissociation en évidence. L'emploi de milieu à base de gélose ou à base de sérum coagulé, donne des résultats différents et parfois contradictoires. Il serait intéressant de pouvoir comparer les types obtenus sur ces différents milieux. Le fait que la forme habituelle de la B. Charbonneuse se présente sous le type R sur gélose et sous le type S sur sérum coagulé, montre bien que le milieu joue un rôle très important, et que des précisions sont nécessaires.

Viridis en 1935, a donné les caractères morphologiques, biologiques et biochimiques des types de dissociation qu'il a obtenus en cultivant la B. Charbonneuse en association avec le B. Coli. Pour ses expériences, Viridis ensemence dans des tubes contenant 5 à 6 cc. de bouillon, une anse de platine de B. Coli et de B. Charbonneuse prélevée sur une culture sur gélose de 24 h. Il laisse les tubes à l'étuve à 37° pendant 48 h. et ensemence en boîtes de Pétri. Puis à partir des cultures ainsi obtenues, il ensemence du bouillon dans les mêmes conditions que précédemment. Il obtient à partir du 11^e passage des modifications chez la B. Charbonneuse. Ces examens sont effectués sur gélose. Viridis obtient les trois types suivants :

Type I. — Colonies typiques de B. Charbonneuse avec surface rude, à bords déchiquetés, en tête de Mé-

duse. Les éléments microbiens sont en chaîne, présentent des spores et sont encapsulés.

Type II. — Colonies un peu plus petites, avec une surface tendant à devenir lisse et de coloration blanchâtre, obscure dans la zone centrale, mais avec un anneau clair et légèrement rude à la périphérie. Les bords sont plutôt réguliers. Les éléments microbiens sont réunis deux à deux, sont sporulés et encapsulés.

Type III. — Colonies beaucoup plus petites, à surface lisse, à contours nets, très blanches. Disparition complète de la tête de Méduse, bords parfaitement réguliers, surface uniformément granuleuse. Les éléments microbiens sont en courtes chaînes de 3 à 4 éléments et beaucoup sont accouplés deux à deux; ils sont sporulés et encapsulés pour le plus grand nombre.

Virdis constate que les colonies RS repiquées donnent naissance à des colonies R et S, et après une dizaine de passages, il obtient des RS pures. Au contraire, les colonies S sont stables dès les premiers repiquages.

Virdis donne pour les deux types R et S les caractères suivants :

1° ASPECT DES COLONIES.

Type R. — Colonies de 2 à 6 mm. de diamètre, constituées par une partie centrale et une partie périphérique bien séparées. La colonie est granuleuse, sèche, et, de la périphérie, partent des filaments qui s'éloignent beaucoup des bords. La colonie est plutôt plate; au microscope, on trouve soit la forme en tête de Méduse, soit une forme à bords très déchiquetés.

Type S. — Colonies plus petites que les précédentes : 1 à 3 mm. de diamètre, à contours nets, à surface lisse, blanchâtre. Au microscope, on note la disparition de la tête de Méduse et de l'aspect déchiqueté.

2° CULTURE EN BOUILLON.

Type R. — Formation de filaments qui se sédimentent au fond en laissant le liquide surnageant clair.

Type S. — Donne un trouble dans le bouillon mais donne un dépôt au fond facilement soluble.

3° CULTURE EN GÉLATINE.

Type R. — Liquéfaction de la gélatine avec formation d'un cône et apparition de filaments latéraux.

Type S. — Développement par groupes séparés le long du trajet d'inoculation, sans formation de filaments latéraux. La liquéfaction de la gélatine a été normale.

4° COAGULATION DU LAIT.

Type R. — La coagulation du lait s'effectue en 4 jours et la dissolution du caillot en 8 jours.

Type S. — La coagulation s'effectue avec une légère avance.

5° ASPECT DES BACILLES.

Type R. — Bacilles réunis en chaînes très longues, à Gram positif.

Type S. — Bacilles en grande majorité réunis deux à deux.

6° SPORES ET CAPSULES.

Peu de différences en ce qui concerne les spores et les capsules.

7° VIRULENCE.

Type R. — Ce type est très virulent pour la souris, le cobaye et le lapin.

Type S. — Cette forme est virulente uniquement pour la souris, celle-ci meurt avec un certain retard sur les témoins; les cobayes et les lapins résistent à des doses massives inoculées sous-cutanées, et le passage à travers la souris n'a pas pu exalter la virulence vis-à-vis des cobayes.

8° ACTION VACCINALE.

Type S. — Le traitement prolongé des cobayes et des lapins avec la forme S, par inoculation à doses élevées pendant 6 semaines, a immunisé vis-à-vis de la souche normale les lapins mais pas les cobayes.

Nous voyons donc que la dissociation de la Bactérie Charbonneuse par les nombreuses études qu'elle a suscitées, prend une place importante dans cette question de la dissociation. Les recherches que nous avons entreprises dans l'étude de l'association Pyocyanique-Charbon nous ont conduit à une dissociation de la B. Charbonneuse ressemblant en de nombreux points à celle décrite par Viridis. Mais notons ici que nos recherches ont été conduites sans la connaissance de ces résultats par suite des circonstances actuelles qui ne nous ont pas permis de nous procurer le compte rendu de ces travaux en temps voulu.

DEUXIEME PARTIE

**RECHERCHES PERSONNELLES
SUR L'ASSOCIATION
B. PYOCYANIQUE-B. CHARBONNEUSE**

CHAPITRE PREMIER

METHODES DE TRAVAIL

Les recherches récentes sur la dissociation microbienne ont montré la nécessité pour l'expérimentateur de se placer dans des conditions bien précises, afin d'éliminer un certain nombre de facteurs pouvant fausser les résultats observés. Chodat en 1926 souligne l'importance de la pureté de la souche utilisée et montre la nécessité d'opérer sur des cultures provenant d'un germe unique, et celle de prendre toutes les précautions pour que la souche étudiée ne soit pas contaminée par des germes provenant d'une autre colonie ou de l'atmosphère. Marchal, dans un important travail sur les variations et les mutations en Bactériologie, considère ces deux conditions comme une nécessité absolue.

Les méthodes employées pour obtenir ces souches provenant d'un seul germe microbien sont nombreuses, et les bactériologistes ont essayé depuis longtemps d'obtenir de telles cultures. Aussi, nous ne citerons pas toutes les techniques utilisées qui sont exposées en détail dans la thèse de Marchal.

Les techniques modernes, par l'emploi du micro-manipulateur ou par l'emploi de fines pipettes en verre, tubes capillaires dans lesquels Friedberger et Abraham aspirent des bactéries et les isolent ensuite par examen microscopique, ne mettent pas à l'abri des

contaminations par les microbes de l'atmosphère au cours du transport du germe isolé dans un milieu nutritif.

Ces méthodes ont cependant été largement utilisées par les auteurs modernes : Takahashi entre autres, emploie la méthode d'isolement de Nakamura ; au moyen d'une pipette il prélève des germes dans une culture diluée, ceux-ci sont ensuite transportés sur un milieu nutritif, repérés par un examen au microscope.

Hort en 1920, préconise une méthode ayant l'avantage de laisser le germe isolé se développer à l'endroit même où il a été isolé, mais, ici encore, les contaminations par l'air sont possibles.

Pour éviter ces contaminations, Marchal utilise une cellule type Van Tieghem-Le Monnier, constituée par une armature métallique de 25 mm. de diamètre, dont les deux bases sont constituées par des lamelles de verre, permettant, au moyen de bouchons à vis avec joints, de fermer hermétiquement la cellule tout en permettant l'examen microscopique. Un tube latéral muni d'un capuchon métallique percé d'un trou, permet l'ensemencement.

Pour l'utilisation de cette cellule, on dépose au fond une souche de gélose. L'appareil est fermé, un coton obturant le trou du capuchon ; on porte à l'étuve à 105° pendant 30 minutes ; le trou dans le capuchon permet l'évacuation de l'air. Sur la lamelle de verre portant la gélose, on a tracé à l'encre un certain nombre de petits carrés. Cette cellule ainsi préparée permet l'examen au microscope des microbes déposés sur la couche nutritive en évitant au maximum les manipulations au contact de l'air. Pour l'ensemencer, on fait une dilution convenable en eau physiologique d'une culture jeune, et au moyen d'une fine pipette en verre, par l'embouchure latérale et après l'avoir flambée, on pratique une série de piqûres successives

au centre des petits carrés. L'examen au microscope avec un objectif faible à sec et un oculaire fort, en lumière homogène et assez intense, permet de repérer le carré dans lequel on a déposé un seul microbe. La cellule est portée à l'étuve à 37° et on suit au microscope le développement du germe. On effectue les prélèvements des colonies avec les mêmes précautions et on ensemence ensuite en milieu convenable.

* Nous avons fait construire une cellule de ce type et nous avons essayé longtemps d'isoler par cette méthode une Bactéridie unique; (Marchal lui-même dit que cette méthode n'exclut pas une longue pratique et l'examen au microscope durant des heures entières). Mais nous nous sommes heurté à un certain nombre de difficultés qui nous ont fait adopter une autre méthode que nous verrons par la suite. Cette cellule, dont le diamètre est de 25 mm. permet de tracer sur la lamelle (source d'ennuis de par sa fragilité), une dizaine de carrés, et encore ceux-ci sont de dimension réduite. Les Bactéridies Charbonneuses même uniques donnent en 24 heures des colonies très étalées et plusieurs fois les colonies obtenues avaient envahi plus d'un carré. D'autre part la couche de gélose déposée présente une surface d'évaporation très grande et la stérilisation provoque une évaporation telle que le milieu nutritif est beaucoup trop concentré et inutilisable.

Devant ces difficultés, nous avons préféré utiliser la technique suivante qui nous a donné de bien meilleurs résultats avec autant de garanties au point de vue des contaminations.

Nous avons utilisé des boîtes de verre (genre boîte de Roux), ayant deux faces planes, et présentant une embouchure latérale de 2 à 3 cm. de long. Ces boîtes ovalaires, d'un diamètre moyen de 5 cm. et d'une épaisseur de 1 cm., dont les parois planes sont en ver-

re mince et suffisamment pur, sont stérilisées à sec, l'ouverture étant obturée par un coton. La gélose, soigneusement collée avec un blanc d'œuf, afin de la rendre très transparente, est introduite dans la boîte; on stérilise à 105° pendant 30 minutes, la boîte étant en position verticale. La stérilisation terminée, la gélose étant encore fluide, on couche la boîte pour étaler la gélose sur une des faces. Ainsi, nous supprimons l'évaporation et nous obtenons une couche nutritive suffisante. Nous traçons à l'encre sur la face externe de la boîte, face correspondant à la gélose, un certain nombre de carrés de 5 mm. de côté, et nous les repérons en colonnes verticales et horizontales. La boîte, ainsi préparée, est prête à être ensemencée.

Nous préparons, à partir d'une culture de 24 h. de Bactéridie Charbonneuse, une dilution convenable en eau physiologique. A l'aide d'un fil de platine recourbé à son extrémité à angle droit sur 1 mm. (afin d'utiliser uniquement l'extrémité du fil), et après avoir flambé l'embouchure de notre boîte, nous touchons successivement le centre de chaque carré avec notre fil chargé de l'émulsion microbienne; nous opérons ainsi dans des conditions analogues à celles préconisées par Marchal, nous mettant au maximum à l'abri des contaminations. Il est nécessaire de toucher très légèrement la couche nutritive, car toute discontinuité de la couche superficielle de la gélose rend l'examen microscopique impossible.

Nous portons notre boîte sous le microscope (objectif faible et oculaire fort), en lumière intense et fortement diaphragmée; les bacilles sont nettement visibles. Nous repérons le carré dans lequel ne se trouve qu'une seule bactérie, et nous portons à l'étuve à 37° . Nous examinons au bout de 12 et 24 h.; nous suivons ainsi le développement *in situ* de la Bactéridie et quand la colonie obtenue est visible à l'œil nu, nous effec-

tuons le prélèvement et le transport de cette colonie avec les mêmes précautions que précédemment.

Ainsi nous avons pu obtenir, avec cependant certaines difficultés, 3 souches de *B. Charbonneuse* ayant pour origine un seul élément microbien. Mais il va sans dire que par cette méthode, si quelques difficultés d'ordre pratique ont été évitées, le repérage d'une Bactéridie Charbonneuse isolée, sans coloration et avec un grossissement faible, a demandé des examens microscopiques durant des heures entières.

Par cette méthode, nous estimons nous être placés dans les conditions préconisées par Chodat et Marchal, évitant les contaminations. Les souches obtenues, repiquées régulièrement pendant toute la durée de nos expériences nous ont toujours montré une homogénéité complète au point de vue des colonies obtenues.

CHAPITRE II

EXPERIENCES PERSONNELLES

I. — Caractères des souches utilisées

1° *Bactéridie Charbonneuse*. — A partir d'une culture de 24 heures en bouillon provenant d'une souche de B. Charbonneuse de la collection du laboratoire, nous avons obtenu, en appliquant la méthode décrite précédemment, trois souches d'origine monomicrobienne dénommées B, C et D. Nos expériences ont été faites, pour la plus grande part, à partir de la souche B. Celle-ci a été obtenue de la manière suivante : la Bactéridie isolée et repérée donne naissance après 10 heures d'étuve à 37° à un long filament contourné sur lui-même (bacille en 8 de Pasteur). Après 18 heures d'étuve, le filament s'est allongé et est très entremêlé. Après 22 heures d'étuve, nous avons une colonie visible uniquement au microscope, en peloton de ficelle, située au centre du carré repère. Nous prélevons cette colonie, et nous l'ensemencions en bouillon (nous vérifions au microscope que seule cette colonie a été prélevée). En 24 heures à 37° nous obtenons une culture donnant un trouble homogène. Ensemencée sur gélose et sur sérum coagulé en boîtes de Pétri, cette culture nous donne des colonies présentant les caractères suivants :

Sur gélose : colonies blanchâtres, à contours légèrement ondulés; la partie centrale est légèrement surélevée; microscopiquement, les colonies présentent une partie centrale opaque à disposition mal définie, et une partie périphérique plus claire, à disposition ondulée très marquée. Les éléments microbiens sont réunis en longues chaînes de 10 à 15 éléments, Gram positif.

Sur sérum coagulé : les colonies ont le même aspect, mais les ondulations périphériques sont plus marquées.

Ces colonies sont légèrement granuleuses et présentent un aspect crémeux. Elles ont une surface brillante.

2° *Bacille Pyocyannique*. — Nous avons utilisé une souche conservée au laboratoire qui donne naissance à des colonies ayant les caractères suivants sur gélose et sur sérum coagulé :

Sur gélose : colonies cycliques, bien régulières, à centre brun, donnant lieu à une large zone périphérique déchiquetée claire (liquéfaction) et colorant le milieu en vert-jaune.

Sur sérum coagulé : colonies cylindriques, déprimées et claires au centre, également entourées d'une zone irrégulière périphérique.

Ces caractères sont nettement différents et nous permettent de différencier très facilement les deux microbes.

A partir de ces souches, nous avons effectué deux séries d'expériences différentes :

1° Nous avons cultivé dans le même milieu et dans des conditions que nous préciserons, des Bactéridies de la souche B, et des bacilles Pyocyanniques.

2° Nous avons étudié le développement de Bacté-

ridies de la souche B dans du bouillon contenant des proportions variables de filtrat sur bougie L3 de cultures de 48 h. de Pyocyanique en bouillon.

Les deux séries d'expériences nous ont donné des résultats très différents; et nous verrons par la suite que, si la première série d'expériences nous a confirmé la puissance de l'antibiose du B. Pyocyanique pour la B. Charbonneuse, seule la deuxième série d'expériences nous a permis d'obtenir une dissociation de la B. Charbonneuse.

II. — Cultures mixtes de B. Pyocyanique et de B. Charbonneuse

1^{re} expérience. — Dans un tube de bouillon, nous ensemençons une goutte de culture de 24 h. en bouillon de B. Pyocyanique et une goutte de culture de 24 h. en bouillon de B. Charbonneuse.

Ces cultures sont examinées après 24 h. d'étuve à 37°. Elles présentent les caractères d'une culture de B. Pyocyanique; un examen sur lame montre de très rares B. Charbonneuses et après ensemencement sur gélose et sur sérum coagulé en boîtes de Pétri, nous ne retrouvons dans les boîtes que des colonies de B. Pyocyanique. Après 48 heures d'étuve, nous ne retrouvons aucune B. Charbonneuse par examen sur lame.

2^e expérience. — Nous avons ensemencé dans un tube de bouillon, une goutte de culture en bouillon de B. Charbonneuse et une goutte d'une dilution au 1/10^e en eau physiologique d'une culture en bouillon de B. Pyocyanique. Après 24 et 48 heures d'étuve à 37°, les B. Charbonneuses ont complètement disparu.

3^e expérience. — Nous avons ensemencé une goutte de culture de B. Pyocyanique dans une culture en

bouillon âgée de 24 heures de B. Charbonneuse. Les examens identiques aux précédents nous ont montré la disparition complète des B. Charbonneuses au bout de 48 heures

4^e expérience. — Nous avons employé la méthode de Pane et d'Agata pour obtenir un vaccin anticharbonneux; à cet effet, une culture de 3 jours en bouillon de B. Pyocyanique est portée à l'étuve à 55° pendant 1 heure. Dans des tubes stériles, nous mettons 2 cc. de cette culture chauffée et 2 cc. d'une culture de 24 h. en bouillon de B. Charbonneuse. Nous laissons en contact 8 jours à 37°. Nous ensemençons sur gélose en boîtes de Pétri et en 24 heures nous n'obtenons que des colonies de B. Pyocyanique, présentant les caractères habituels. Cette expérience a été faite avec les trois souches B, C, et D.

5^e expérience. — Dans un tube de gélose inclinée, nous avonsensemencé par piqûre des B. Pyocyaniques et des B. Charbonneuses, à 1 cm. de distance. Après 24 heures d'étuve à 37°, les colonies se sont développées normalement; au quatrième jour, les colonies sont au contact; nous prélevons des germes dans la zone de contact, et nous les ensemençons sur gélose en boîtes de Pétri et en bouillon. Après 24 heures d'étuve, nous obtenons sur les boîtes des cultures mixtes, comprenant une nappe continue de B. Pyocyanique et quelques colonies en relief, blanches, ayant les caractères microscopiques des colonies de B. Charbonneuse. Une de ces colonies prélevée et ensemencée sur gélose en boîtes de Pétri, donne après 24 heures d'étuve, un aspect analogue au précédent. Dans les cultures en bouillon, nous ne retrouvons que des B. Pyocyaniques. Cette même opération, répétée plusieurs fois, ne nous a pas permis d'isoler, même en utilisant de très grandes dilutions, une colonie de B. Charbon-

neuse. Notons que, après le quatrième passage, les colonies de B. Charbonneuse présentaient des ondulations plus marquées que normalement.

Résultats de ces expériences.

Ces différentes expériences nous ont montré que l'antibiose du B. Pyocyanique vis-à-vis de la B. Charbonneuse est extrêmement puissant :

a) le développement de souches jeunes de B. Charbonneuse même en excès vis-à-vis du B. Pyocyanique, est arrêté en 48 heures.

b) les B. Pyocyaniques après chauffage à 55° pendant une heure ne sont pas détruits et gardent un pouvoir antibiotique suffisant pour empêcher le développement des B. Charbonneuses.

c) des B. Pyocyaniques ensemencés dans une culture de 24 heures de B. Charbonneuse, inhibent celle-ci.

d) la dernière expérience nous a permis d'obtenir des cultures mixtes mais l'impossibilité d'isoler les colonies de B. Charbonneuse rend l'étude de ces dernières impossible. Notons cependant qu'une légère modification dans l'aspect des colonies a été observée.

N'ayant pu obtenir le développement de B. Charbonneuse en présence de B. Pyocyanique, dans les conditions précédentes, nous avons étudié le développement des B. Charbonneuses dans un milieu contenant des proportions variables de filtrat de culture de B. Pyocyanique.

III. — Cultures de B. Charbonneuse dans la Pyocyanase

Nous donnons, pour simplifier l'exposé, le nom de « Pyocyanase » au filtrat obtenu par passage à travers une bougie L3, de cultures de 48 heures de B.

Pyocyanique en bouillon, bien que ce filtrat ne corresponde pas au produit appelé Pyocyanase dans les expériences de Emmerich et Loew que nous avons citées précédemment.

1^{re} expérience. — Nous avonsensemencé des B. Charbonneuses provenant de cultures de 24 h., dans des tubes contenant de la Pyocyanase pure. Après 24 heures d'étuve à 37°, toutes les B. Charbonneuses ont disparu.

Nous avons donc utilisé par la suite des milieux contenant des proportions variables de Pyocyanase : 1/10, 1/20 et 1/50.

2^e expérience. — Nous employons les dilutions suivantes 1/10, 1/20 et 1/50 de Pyocyanase dans du bouillon. Les tubes sont appelés respectivement N/10, N/20, N/50; un tube témoin T contient du bouillon pur. Les cultures de B. Charbonneuse utilisées sont des cultures en bouillon âgées de 24 h., provenant de la souche B.

Dans les tubes N/10, N/20 et N/50 ainsi que dans T, nous ensemençons une goutte de culture de B; nous mettons à l'étuve à 37° et nous examinons par ensemencement sur gélose et sur sérum coagulé en boîtes de Pétri, après 24 h., 48 h. et 3 jours.

Après 24 heures, nous n'obtenons que quelques rares colonies d'aspect normal.

Après 48 heures, les colonies sont normales.

Après 3 jours, sur gélose, les colonies provenant des tubes N/10, N/20 et N/50 paraissent plus ternes, plus transparentes, plates et à bords moins régulièrement ondulés que les colonies témoins T. Sur sérum coagulé, les colonies présentent toutes un aspect normal.

Après huit jours d'étuve, nous constatons les mêmes modifications, très légères cependant.

Nous pratiquons alors une série de repiquages de

ces cultures et de la culture témoin, dans des milieux identiques aux précédents, repiquages effectués tous les trois jours. L'examen des cultures obtenues est fait par ensemencement sur gélose en boîtes de Pétri (nous n'avons pas pu pratiquer régulièrement les ensemencements sur sérum coagulé). Les colonies sont ensuite examinées macroscopiquement et microscopiquement, et un examen sur lame nous permet de noter la disposition des éléments microbiens et leur colorabilité.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

1° Au quatrième repiquage, de nombreuses colonies provenant de N/50 présentent des bords déchiquetés, constitués par des filaments s'éloignant beaucoup des bords de la colonie.

Celle-ci est, par ailleurs, identique aux colonies témoins. Cette légère modification sera retrouvée dans plusieurs boîtes et aussi dans les colonies témoins.

2° Au sixième repiquage, à côté de nombreuses colonies normales, certaines colonies provenant de N/20 sont plus transparentes, ternes. Ces colonies sont minces, non crémeuses, présentant une large ombilication centrale. La disposition en ondulations claires est nettement visible jusqu'au centre de la colonie. Les colonies témoins ont gardé le type des colonies de la souche B.

Ces colonies modifiées, isolées à l'état pur après 3 repiquages gardent un certain temps leurs caractères nouveaux, mais après 6 repiquages, nous notons une certaine tendance au retour au type initial : la partie centrale se fonce, la disposition en ondulations ne reste visible qu'à la périphérie et l'aspect redevient crémeux. Ces colonies modifiées conservées 8 jours à la température du laboratoire, montrent une accentuation de ces caractères différentiels : elles restent très transparentes et plates, tandis que les colonies normales deviennent très opaques, plus crémeuses et jaunâtres.

3° Au dixième repiquage, à partir des tubes N/20 et N/50, nous obtenons à côté des colonies à type habituel, deux types très différents et très nets de colonies : (la culture N/10 présente les mêmes modifications mais elle a été contaminée au cours du dernier repiquage).

a) Nous avons de nombreuses colonies, petites (1 à 2 mm. de diamètre), rondes, lisses, brillantes, opaques. Au microscope, les bords apparaissent absolument circulaires, sans aucune ondulation ni filaments périphériques ; la disposition en ondulations a complètement disparu, et la colonie apparaît comme homogène, d'opacité régulièrement décroissante du centre à la périphérie.

Ces colonies peuvent être considérées comme appartenant morphologiquement au type S.

b) A côté de ces colonies, nous avons des colonies plus grandes (4 à 5 mm. de diamètre), étalées, rondes, granuleuses, plates, mates et transparentes. Microscopiquement, les bords apparaissent largement ondulés, et cette disposition en ondulations larges et claires se retrouve nettement jusqu'au centre de la colonie. Ces colonies appartiennent morphologiquement au type R.

c) Les colonies ayant gardé l'aspect habituel de la souche B, présentent des caractères mixtes, et nous les considérons comme appartenant à un type intermédiaire RS.

Par cette méthode expérimentale, nous avons donc obtenu après le dixième repiquage, une modification nette dans l'aspect morphologique de la souche B. Nous avons obtenu, par des isolements successifs, une souche pure des types R et S et nous avons étudié les caractères de ces types de dissociation de la B. Charbonneuse.

Notons que nos résultats coïncident avec ceux de Virdis. La modification obtenue au quatrième repiqua-

ge, consistant en l'apparition de colonies à bords très déchiquetés est également notée par cet auteur, puisqu'il considère la forme R comme susceptible de présenter soit des bords régulièrement ondulés, soit des contours déchiquetés. Les types R et S que nous avons obtenus coïncident, au point de vue de leur aspect morphologique, à ceux décrits par Viridis. Et d'autre part, comme nous avons isolé la souche B à partir d'une culture quelconque, la bactérie origine de cette souche était vraisemblablement d'un type moyen, donc RS. Cette souche B nous a d'ailleurs toujours donné des colonies identiques, pendant toutes nos expériences durant lesquelles elle a été soumise aux mêmes conditions de repiquage que les autres cultures.

CHAPITRE III

ETUDE DE LA DISSOCIATION OBTENUE

Nous avons étudié les caractères morphologiques des colonies des deux types, obtenues par ensemencement, sur gélose ordinaire et sur sérum de cheval coagulé en boîtes de Pétri, de une ou deux gouttes de cultures en bouillon, diluées en eau physiologique. Les colonies obtenues après 24 heures d'étuve à 37° présentent les caractères suivants :

1° ASPECT MACROSCOPIQUE DES COLONIES SUR GÉLOSE :

Type R. — Colonies de 6 à 8 mm. de diamètres, étalées, rondes, granuleuses, plates et transparentes.

Type S. — Colonies de 1 à 2 mm. de diamètre, rondes, lisses, brillantes, en dôme et opaques.

Type RS. — Colonies de type habituel des B. Charbonneuses : colonies de 4 à 6 mm. de diamètre, aspect en tête de Méduse, brillantes, lisses, à bords réguliers ou déchiquetés.

2° ASPECT MICROSCOPIQUE DES COLONIES SUR GÉLOSE :

Type R. — Les bords des colonies sont largement ondulés; la disposition en larges ondulations claires se retrouve jusqu'au centre de la colonie.

Les Bactéridies sont disposées en longues chaînes de 10 à 15 éléments; tous les éléments sont Gram positif et encapsulés; les capsules paraissent cependant irrégulières et souvent mal limitées.

Type S. — Les bords des colonies sont absolument réguliers, sans ondulations; la colonie apparaît homogène, d'opacité décroissante du centre à la périphérie. La disposition en larges ondulations a complètement disparu.

Les Bactéridies sont disposées en courtes chaînes de 3 ou 4 éléments et souvent groupées deux par deux. elles sont toutes Gram positif et très régulièrement encapsulées.

Type RS. — Les bords plus ou moins ondulés ou déchiquetés, présentent de longs filaments s'éloignant de la colonie; la disposition en ondulations n'est visible qu'à la périphérie de la colonie; le centre est homogène.

3° ASPECT DES COLONIES SUR SÉRUM COAGULÉ :

Macroscopiquement, les colonies provenant des types R et S sont identiques : petites, lisses, brillantes.

Microscopiquement, les colonies R ont un aspect homogène et seules les colonies de la souche S présentent la disposition en ondulations signalée précédemment. Remarquons que nous avons ici des aspects différents suivant le milieu : nous retrouvons les résultats de Schaefer qui a montré que certains types, R ou S sur gélose, se présentaient sous l'aspect S sur sérum coagulé.

4° CULTURE EN BOUILLON :

Après 24 heures d'étuve à 37°, R donne naissance à un léger voile en surface, se dissociant par agitation,

avec un filament qui se sédimente au fond. Le type S ne donne pas de voile; la culture paraît homogène et présente un léger dépôt granuleux au fond.

5° ACTION PROTÉOLYTIQUE :

Après 48 heures d'étuve à 37°, les colonies R se sont développées sur tout le trajet d'inoculation. La gélatine est liquéfiée à la partie supérieure, en cône, avec présence de filaments latéraux. Les colonies S se sont développées d'une manière discontinue sur le trajet d'inoculation. La liquéfaction est normale mais il n'y a pas de filaments latéraux.

6° AGGLUTINATION NON SPÉCIFIQUE PAR LA TRYPAFLAVINE :

Appliquant la méthode d'Alessandrini et de Sabatucci, nous avons étudié l'agglutination des émulsions obtenues à partir de cultures sur gélose des souches R et S, en employant la trypaflavine aux taux de 1/200, 1/500 et 1/1.000. Après 24 heures d'étuve à 37°, les trois tubes R présentent de gros flocons, avec dépôt au fond. Par agitation ces flocons tombent au fond sans se dissocier. Le type S montre au contraire des cultures limpides, avec un dépôt au fond. Nous avons obtenu les mêmes résultats aux différents taux étudiés.

Après 24 heures de repos à la température ordinaire, les émulsions S ne se sont pas modifiées, tandis que les émulsions R présentent un dépôt granuleux au fond avec un liquide surnageant clair. Les émulsions de type S semblent donc plus stables.

7° AGGLUTINATION NON SPÉCIFIQUE PAR LE NaCl :

Avec des solutions de chlorure de sodium dans l'eau distillée aux concentrations de 2 p. mille, 4 p. mille et 8 p. mille, nous n'avons obtenu aucune agglutination.

8° AGGLUTINATION NON SPÉCIFIQUE PAR LA CHALEUR :

Après 5 minutes à 100°, les émulsions R se clarifient avec dépôt au fond, tandis que les émulsions S restent homogènes.

9° STABILITÉ DES TYPES R ET S :

Les souches R et S pures, repiquées tous les deux jours dans du bouillon ordinaire contenant 5 % de Pyocyanase conservent leurs caractères morphologiques. Cependant après quelques repiquages, nous avons noté l'apparition parmi les colonies R ou S, de colonies du type intermédiaire RS, en petit nombre.

Les souches R et S, conservées en bouillon ordinaire ou sur gélose, à la température ordinaire ou à 37°, pendant un mois, montrent un certain retour au type RS habituel. Un certain nombre de colonies présentent les types R ou S. Celles-ci, isolées à nouveau, présentent tous les caractères morphologiques cités précédemment et les conservent par culture en bouillon additionné de Pyocyanase dans la proportion de 5 %. Les souches S paraissent plus stables que les souches R.

Ces différentes expériences nous montrent que les types de dissociation obtenus sont stables lorsque nous les cultivons dans un milieu identique à celui dans lequel ils ont pris naissance. Au contraire, cultivées en bouillon ordinaire ou sur gélose, les souches R et S ont une tendance assez marquée à retourner au type initial.

Cette étude est évidemment très incomplète. Le manque de temps dû aux circonstances douloureuses que nous traversons ne nous ayant pas permis de l'achever.

CONCLUSIONS

1° L'étude des rapports entre les associations et les dissociations microbiennes a été à peine amorcée. Tout au plus peut-on citer le travail de l'Italien Viridis en 1935.

2° L'intérêt de cette étude est cependant considérable pour expliquer l'apparition et la disparition de la virulence, cette dernière étant sous la dépendance des types de dissociation.

3° Toute étude de dissociation nécessite l'utilisation de souches à origine monomicrobienne. L'obtention d'une telle souche, à l'état de pureté, entourée de réelles difficultés, est le travail préalable indispensable pour une telle étude.

4° Nous avons étudié l'action de l'association Bacille Pyocyanique-Bactéridie Charbonneuse, au point de vue de la dissociation de ce dernier microbe en types R et S.

5° Il est impossible de cultiver en association ces deux microbes, le Bacille Pyocyanique, même associé à très faible dose au moment de l'ensemencement, à la Bactéridie Charbonneuse, fait disparaître rapidement cette dernière.

6° Même chauffée à 55° C. pendant une heure, une culture de Bacille Pyocyanique conserve un pouvoir antibiotique suffisant pour inhiber les cultures de Bactéridie Charbonneuse.

7° L'action du filtrat de cultures de Bacille Pyocyanique sur la Bactéridie Charbonneuse nous a donné une dissociation en types R et S.

8° Les types de dissociation se différencient par les caractères suivants :

a) aspect morphologique macroscopique et microscopique;

b) aspect des cultures en bouillon;

c) pouvoir protéolytique;

d) réaction d'agglutination non spécifique par la chaleur et par la trypaflavine.

e) stabilité des émulsions à la température ordinaire.

9° Le retour au type mixte RS se fait rapidement en cultures dans les conditions habituelles, tandis que les souches R et S sont stables en bouillon additionné de filtrat de cultures de Pyocyanique.

10° Nous regrettons vivement que le temps et les circonstances ne nous aient pas permis d'achever ce travail par l'étude de la virulence et du pouvoir antigène, mais quand cette action sera suffisamment connue et étendue aux autres microbes, elle permettra sans doute d'en faire un facteur de l'apparition des épidémies et de leurs variations.

Vu :

LE DOYEN :
JEAN LEPINE.

Vu :

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE :
ROCHAIX.

Vu et permis d'imprimer :

Lyon, le 2 Octobre 1942.

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ,
GAU.

BIBLIOGRAPHIE

- AGATA (J. d'). — Sur la vaccination anticharbonneuse (XVI^e Congrès Inter. de Médecine, IV^e section, Budapest. *Ann. Inst. Pasteur*, t. XXIV, 1910, p. 330-336.
- ALESSANDRINI et SABATUCCI. — La trypanflavina quale mezzo di differenziazione dei microbi del genere Brucelli. *Ann. Igiene*, t. XLI, 1931, p. 29-34.
- ANDERSON, HAPPOLD F.-C., Mac LEOD J.-W. et THOMSON J.-G. — On existence of 2 forms of Diphteria bacillus-B. diphteria gravis and B. diphteria mitis-and new medium for their differenciation and for bacteriological diagnosis of diphteria. *Journ. of Path. and Bact.*, 34, sept. 1931, p. 667-681.
- ARKWRIGHT. — Variation in bacteria in relation to agglutination both by salts and by specific serum. *Journ. of Path. and Bact.*, 24, 1921, p. 36-60.
- AZZI (A.). — Dissociazioni microbiche. *Giornale di Batt. e Immunol.*, VIII, mars 1932, p. 303-307.
- BAERTHLEIN (K.). — Ueber bakterielle Variabilität insbesondere sogenannte Bakterienmutationen. *Centrbl. f. Bakt., Orig.*, t. 81; 1918, p. 369-435.
- BAIL (O.) et FLAUMENHAFT (T.). — Versuche mit abgeschwächten Milzbrandbazillen im Meerschweinchenkörper. *Centrbl. f. Bakt., Orig.*, 79, 1917, p. 425-442.
- BEDARIDA (N.-V.). — Manifestazioni batteriologiche nell'antagonismo fra batterio pyocianeo ed alcuni germi isolati da focoli settici. *Giornale di Batt. e Immunol.*, V, 1930, p. 1023-1045.
- BEHRING. — Beiträge zur Aetiologie des Milzbrandes. *Zeitschrift f. Hygien.*, VI, 1889.

- BIRCH (L.)-HIRSCHFELD. — Versuche zur Analyse der Pyocyanase. *Zeitschrift f. Hyg'en und Infekt.*, 1934, p. 304.
- BLAGOVESTSCHENSKY (N.). — Sur l'antagonisme entre les B. du Charbon et du pus bleu. *Ann. Inst. Pasteur*, t. IV 1890, p. 689.
- BONGERT. — Beiträge zur Biologie des Milzbrandbacillus und sein Nachweis im Kadaver der grossen Haustiere. *Centrbl. f. Bakt.*, Orig. 34, 1903, p. 497, 623 et 772.
- BORDET et RENAUX (E.). — L'influence du Calcium sur l'évolution des cultures de Charbon. *Ann. Inst. Pasteur*, t. XLV, 1930, p. 26-41.
- BOUCHARD. — Influence qu'exerce sur la maladie charbonneuse l'inoculation du B. Pyocyanique. *C. R. Acad. des Sciences*, 1889, p. 713.
- BUONOMINI (G.). — La variabilità del « B. Pyocyaneus » Gessard. *Boll. d. Ist. sieroterap. milanese*, 13, 1934, p. 1002-1014, 1015-1022 et 1023-1028.
- CHARRIN et J. COURMONT. — Atténuation de la Bactériémie Charbonneuse par des principes microbiens; origine de ces principes. *Soc. de Biologie*, 1893. p. 299.
- CHARRIN et GUIGNARD. — Action du Bacille Pyocyanique sur la Bactériémie Charbonneuse. *C. R. Acad. des Sciences*, avril 1889, p. 764.
- CHATTON (E. et M.). — Sur les propriétés et la nature de la cytolysine du B. Pyocyanique. *C. R. Soc. Biologie*, 97, 1927, p. 292.
- CHODAT — Recherches expérimentales sur la mutation chez les champignons. *Bull. Soc. Bot. de Genève*, Série II vol. 28, 1926.
- CLAUBERG (K.-W.), W. HELMREICH et R.-W. VIERTHALER. — La question de la constance du type chez les Bacilles de la Diphtérie. *Klin. Wchnschr*, 15, 7, 1936, p. 231-233.
- CORMIO. — Su alcune delle condizioni nelle quali si ottengono bacilli asporogeni del carbonchio, vaccini, dissociazioni e mutazioni. *Giornale di Batt. e Immunol.*, X, 1933, p. 657-688.

- DELARBRE. — Recherches expérimentales sur l'antagonisme du B. Pyocyannique et du B. Charbonneux. *Thèse Médecine* Paris 1906, 46 pages.
- EMMERICH et LOEW. — Immunitaet und die Heilung von Infektionskrankheiten durch dieselben. *Zeitsch. f. Hygien.* Bd. 31, 1899, p. 1-65.
- *FABRIS (A.). — Antagonisme entre B. Anthracis et B. Pyocyannique. *Boll. d. Inst. sieroterap. milanese* VI, 1927, p. 81-91
- FAVIA (N.). — Contributo alla dissociazione del B. Anthracis. *Ann. Ig.* XLII, 1932, p. 564-577.
- FORTINEAU. — Notes sur le traitement du Charbon par la Pyocynanase. *Ann. Inst. Pasteur*, t. XXIV, 1910, p. 955-972.
- Sur le traitement curatif du Charbon par la Pyocynanase. *C. R. Acad. des Sciences*, V, 1, 1910, p. 1454.
- FREUDENREICH (E.). — Notes de laboratoire sur l'action du B. Pyocyannique sur la B. Charbonneuse. *Annales de Microbiologie*, II, 1890, p. 1-12.
- FRIEDBERGER (E.) et A. ABRAHAM. — Ueber den Nährwert von rohen und gekochten Hühnereiern. *Deutsche Med. Wchnschr.*, 55, 1929, p. 396-397.
- GHEORGHU (I.). — Sur la dégénération d'une souche de B. charbonneuse. *C. R. Soc. de Biologie*, CXVI, 1934, p. 465-466.
- * GORECKY (L.). — Action bactéricide de la Pyocynanase. *Centrbl. f. Bakt.* 128, 1933, p. 483-488.
- GORRIERI. — L'influenza del Calcio e degli osalati sul B. Anthracis. *Boll. d. Inst. sieroterap. milanese*, XII, 1933, p. 402-406.
- GUNDEL Max. — Die klinische und epidemiologische Bedeutung der Typen des Diptheriebacillus. *Klin. Wchnschr.*, 15, 1936, p. 1871-1875.
- HENRI. — Modification des caractères morphologiques et biologiques de la Bactéridie Charbonneuse. *C. R. Acad. des Sciences*, t. 151, 1914, p. 340.

HILGERS (W.) et THOENES (F.). — Die Bedeutung der Diphtheriebazillentypen für die Klinik der Diphtherie. *Jahrb. f. Kinderh.*, 147, 1936, p. 339, et *Klin. Wchnschr.*, 15, 1936, p. 589-594.

HORNUS (G.). — La périodicité saisonnière des maladies épidémiques et en particulier de la polyomyélite. *Masson et Cie, Edit., Paris*, 1935.

ISABOLENSKY (M.). — Zur Frage über die Eigenschaften der Pyocyanase. *Centrbl. f. Bak., Orig.*, t. 76, 1913, p. 532-540.

JAUSION (H.). — Un type d'infection cutanée : le cycle staphylococcique. *Bull. de Dermatologie et de Syphiligraphie*, t. 46, 1939, p. 358.

LEVADITI et HORNUS (G.). — Contribution à l'étude des variations de la virulence du virus poliomyélitique, en rapport avec la périodicité saisonnière des épidémies de poliomyélite. *Bull. Acad. de Méd.*, t. 107, 1932.

LEOD (J. W. Mac), HESTER E. de C. WOOCOOK. — Anatomico-pathology of gravis, intermediate and mitis Diphtheriae. *Journ. of Patho. and Bact.*, 46, 1939, p. 99-123.

LOCEIN et Ch. FORTINEAU. — Traitement du Charbon bactérien par des injections de cultures pyocyaniques stérilisées. *C. R. Acad. des Sciences*, avril 1914.

MAIR (W.). — The different forms of Corynebacterium Diphtheriae and their signification. *Journ. of Path. and Bact.*, 1936, p. 635-646.

MARCHAL. — Variations et mutations en Bactériologie. *Thèse Sciences Nancy*, 1932.

MAZZETTI. — Contributo alla conoscenza dei fenomeni dissociativi del « Bacillus Anthracis ». *Boll. a. Ist. sieroterap. milanese*, XI, 1932, p. 767-804.

— Culture atténuée en bouillon acide (pH 5,5) et alcalin (pH 8,3). Son importance comme excitant de la dissociation microbienne. *Boll. Sez. it. Soc. Intern. de Microb.*, IV, 1932, p. 529-537.

- MURRAY. — Stability of gravis, mitis types. *British Journ. Exp. Pathol.*, X, 1935.
- NETTER in *C. R. Soc. Biologie*, CVI, 1931, p. 28.
- NUNGESTER. — Dissociation of *Bacillus Anthracis*. *Journ. of Inf. Dis.*, XLIX, 1929, p. 73-125.
- PALLERONI. — Sull'azione mutua di taluni bacteri. *Riforma medica*, t. X, 1894, p. 228.
- PANE (N.). — Ueber die Bakteriziden von einigen Milzbrandezillhan Antagonisten Microben ausziëhbaren Substanzen. *Centrbl. f. Bakt.*, Orig. LIV. 1910, p. 457-461.
- PAPACOSTAS (G.) et J. GATÉ. — Les associations microbiennes. Leurs applications thérapeutiques. *G. Doin, Edit. Paris* 1928.
- PASTEUR. — Etudes sur la Bactéridie Charbonneuse. *C. R. Acad. des Sciences*, t. XCV, 1877, p. 107.
- PESCH et HETTCHÉ. — Diagnostic et modifications expérimentales des trois types de B. Diphtérique. *Klin. Wchnschr.*, 1936.
- PHISALIX (C.). — Influence de la chaleur sur la propriété sporogène du *Bacillus Anthracis*; abolition persistante de cette fonction par hérédité des caractères acquis. *Arch. de Physiol norm. et Patho.*, 1893, p. 217-225.
- PREUNER (R.). — Diphteriestudien. *Centrbl. f. Bakt.*, 136, 1936, p. 463, et 137, 1936, p. 112.
- RAUTBISCHEK et V. K. RUSS. — Zur Kenntniss der bakteriziden Eigenschaften der Pyocyanase. *Centrbl. f. Bakt.*, 48, 1908, p. 114.
- ROBINSON. — Further investigations on gravis, mitis and intermediate types; type stability. *Journ. of Patho. and Bact.*, 39, 1934.
- ROCHAIX (A.) et RIVOLLIÉ. — Recherches sur une dissociation du staphylocoque. *Ann. Inst. Pasteur*, 62, 1939, p. 577.
- Staphylocoques blancs et staphylocoques dorés. *Le Progrès Médical*, n° 29, 1939, p. 1045-1046.
- ROUX. — Bactéridie Charbonneuse asporogène. *Ann. Inst. Pasteur*, 4, 1890, p. 25.

- ROUX et CHAMBERLAND. — Sur l'atténuation de la virulence de la Bactéridie Charbonneuse, sous l'influence des substances antiseptiques. *C. R. Acad. des Sciences*, 96, 1883.
- SANARELLI (G.) et ALESSANDRINI. — Atténuation graduée, permanente, héréditaire de la B. Charbonneuse par la lymphe péritonéale de lapin. *Ann. Inst. Pasteur*, 51, 1933, p. 40-51.
- SCHAEFER. — Morphologie de la Bactéridie Charbonneuse. *C. R. Soc. de Biologie*, 23, 1936, p. 897-899.
- Dissociation de la Bactéridie Charbonneuse. *C. R. Soc. de Biologie* 25, 1936, p. 1178-1181.
- SHONE, TUCKER, GLASS et WRIGHT. — The laboratory diagnostic of Diptheria. *Journ. of Patho. and Bact.*, 48, 1939, p. 129-138.
- SILBERSCHMIDT (W.) et E. SCHOCH. — Contribution à l'étude des microbes antagonistes de la B. Charbonneuse. *Ann. Inst. Pasteur*, 34, 1920.
- *STERNE (M.). — Variation in Bacillus Anthracis. *Onderstepoort Journ. of Veter Sc. and An. Ind.*, F. VIII, 1937, p. 292-349, in *Bull. I. P.* 1938, p. 984-985.
- TAKAHASHI (Y.). — Dissociation de la Bactéridie Charbonneuse à partir d'un germe unique. *C. R. Soc. Biologie*, 127, 1938, p. 399-402.
- Essais sur la variabilité du B. Anthracis à partir de germes isolés au micromanipulateur. *Ann. Inst. Pasteur*, 1939, p. 407.
- TOMKINS (H.). — Note on the cultivation of Bacillus anthracis. *The British Med. Journ.*, V, 1887, p. 328.
- TOPLEY. — The spread of bacterial infection: the potential infectivity of a surviving mouse population, and their resistance to subsequent epidemics of the same disease. *Journ. of Hyg.*, 20, 1921, p. 103-109.
- TOPLEY (W. W. C.) et AYRTON. — The segregation of biological factors in B. enteridis (Aertrycke. *Journ of Hyg.* 22, 1923, p. 305-313.
- * TROSSARELLI (L.). — Phénomène de dissociation. *Giornale di Batt. e Immunol.*, X, 1933, p. 800-807.

- URBAIN (A.). — Nouvelle technique de préparation d'un sérum anticharbonneux. *C. R. Soc. Biologie*, 107, 1931, p. 477.
- URBAIN et T. KOWARSKI. — Antagonisme entre divers germes et la B. Charbonneuse. *C. R. Soc. de Biologie*, 115, 1934, p. 1085.
- VANNI (S.). — Recherches des variations sur des germes cultivés en association avec le bacille tuberculeux. Observations sur une souche de B. Charbonneuse. *Soc. Intern. de Microbiol. Boll. d. sez. ital.* VI, 1934, p. 20-28.
- VIGNAUD. — Traitement du Charbon par la Pyocyanase. *Presse médicale*, 1912, p. 678.
- VIRDIS (F.). — La dissociazione del Bacillus Anthracis provocata dal Bacterium Coli e dai suoi filtrati. *Giornale di Clinica Medica*, XIII, 1935.
- VOGELSANG (T. M.). — Ueber das Vorkommen on glatten (« S ») und rauhen (« R ») Formen des Bac. paratyphosus B. Schottmüller in direkter Aussaat frischen Materials. *Centrbl. f. Bakt.*, 125, 1932, p. 513-518.
- WINSLOW (C. E. A.). — Changing bacteria. *Science*, 75, 1932, p. 121.
- WOODHEAD et C. WOOD. — De l'action antidotique exercée par les liquides pyocyaniques sur le cours de la maladie charbonneuse. *C. R. Acad. des Sciences*, t. 109, 1889, p. 985.
- YÜ (H.). — Study on dissociation of diphteria bacillus. *Journ. of Bact.*, XX, 1930, p. 107-120.
- * ZEIDLER (R.). — Usage thérapeutique de la néo-pyocyanase non concentrée. *Med. Klin.*, 1931, p. 1538.
- ZIRONI (A.). Mutazione del bacillo del carbonchio. *Ann. Ig.*, 29, 1919, p. 493-504.
- * ZWICKH. — In *Schematismus der Civil- und Militär Aerzte. München* 1890. M. Rieger, 104 pages, 80.

Nota. — Nous avons voulu que cette bibliographie soit aussi complète que possible. Nous avons fait précéder par une astérisque les articles que nous n'avons pas pu lire par suite des conditions actuelles.

IMPRIMERIE
BOSC FRÈRES, M. & L. RIOU
42, QUAI GAILLETON, 42
LYON

